

THESIS

MUNICH

1968

**Antithrombozytäre  
Isoantikörper  
bei Polytransfundenen**

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
MEDICAL CENTER  
STANFORD, CALIF. 94305

**BRIGITTE LANDRÉANI**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153513\\_0153](https://archive.org/details/IA40153513_0153)



Aus dem Institut für Hämatologie der GSF

Assoziation mit EURATOM, München

( Leiter: Prof. Dr. W. Stich )

ANTITHROMBOZYTÄRE ISOANTIKÖRPER

BEI POLYTRANSFUNDIERTEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Brigitte Andréani

geb. Mühlberger

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| Referent:                   | Prof. Dr. W. S t i c h       |
| Conreferent:                | Prof. Dr. H. S c h w i e g k |
| Dekan:                      | Prof. Dr. F. H o l l e       |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 14. 5. 1968                  |

## Inhalt

### A. Bisherige Untersuchungen

- I. Das Vorkommen von Erythrozytenantigenen an Blutplättchen
- II. Weitere Thrombozytenantigene. Die Definition von Plättchengruppen
- III. Untersuchungsmöglichkeiten
- IV. Chemische und physikalische Eigenschaften der Thrombozytenantigene und ihrer Antikörper
- V. Genetische Untersuchungen an Plättchenantigenen
- VI. Pathophysiologie der komplementbindenden Antikörper
- VII. Die Bedeutung der Antikörperbildung für die Klinik

### B. Eigene Untersuchungen

- I. Methodik und Krankengut
- II. Ergebnisse
- III. Kasuistik der antikörperpositiven Patienten
- IV. Diskussion

### Zusammenfassung

### Literatur



## A. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN

### I. Das Vorkommen von Erythrozytenantigenen an Blutplättchen

Die Untersuchungen über die Antigeneigenschaften von Thrombozyten begannen 1939, als SCHÄFER und GENNERICH (24) das Vorhandensein von A- und B-Blutgruppeneigenschaften auf Thrombozyten nachweisen wollten. Mit Absorptionsversuchen stellten sie fest, daß thrombozytenhaltige Plasmen den Titer von Anti-A und Anti-B-Seren in geringem Maße gruppenspezifisch senken können. Neben DAUSSET und MALINVAUD (12), GUREVITCH und NELKEN (14) und MOUREAU und ANDRÉ (23), die 1954 mit Absorptions- und Agglutinationsversuchen A- und B-Eigenschaften an Blutplättchen nachwiesen, beschäftigte sich auch COOMBS (9) mit der Frage. Er verwendete die Technik der gemischten Thrombozyten-Erythrozyten-Agglutination. Diese Agglutination ergibt sich, wenn Plättchen aus antikörperhaltigem Serum antierythrozytäre Antikörper aufnehmen und dann mit Erythrozyten zusammengebracht werden. Inzwischen haben noch viele Autoren das Problem bearbeitet. THIERFELDER und PFISTERER (30) berichteten 1965 über eine geringere Wiederauffindbarkeit ( " recovery " )  $^{51}\text{Cr}$  - markierter Thrombozyten bei Empfängern, denen Thrombozyten eines Spenders transfundiert worden waren, der eine mit dem Empfänger inkompatible AB-Gruppe hatte.

Analoge Versuche im Rhesussystem scheinen gegen das Vorhandensein von Rhesusantigenen auf Thrombozyten zu sprechen. Andere Autoren dagegen glauben, auch Rh-Antigene auf Thrombozyten nachgewiesen zu haben (10, 19, 20). Eine Zusammenstellung über die Untersuchungen findet sich bei THIERFELDER (30).

### II. Weitere Thrombozytenantigene. Die Definition von Plättchengruppen

In den Jahren ab 1953 gelang es, an Blutplättchen auch noch andere Antigeneigenschaften nachzuweisen. So entdeckten HARRINGTON et al. (15) und STEFANINI et al. (29) Plättchenagglutinine im Serum von Müttern, deren Kinder Neugeborenen-Purpura hatten, und im Serum von mehrfach Transfunden, bei denen die Lebensdauer homologer Plättchen verkürzt war. Erst 1959 jedoch gelang es VAN LOGHEM (18) mit einem Plättchenagglutinin aus dem Serum eines mehrfach Transfunden ein spezifisches Antigen zu definieren, das er  $\text{Zw}^a$  nannte. Das Antigen wurde von SHULMAN (25) im gleichen Jahr entdeckt und  $\text{Pl}^{\text{Al}}$  genannt. Er verwendete den

Komplementbindungstest und einen Antikörper aus dem Serum eines Patienten, der nach Transfusionen eine Thrombopenie entwickelt hatte. Seitdem sind insgesamt 14 Antigengruppen durch die entsprechenden Antikörper identifiziert worden. Einige dieser Antigene haben die Thrombozyten mit Granulozyten und Lymphozyten gemeinsam (PlGrLy<sup>Bl</sup> und PlGrLy<sup>Cl</sup>, sowie III - V der Tabelle 1), und auch mit anderen Geweben scheint eine Antigengemeinschaft zu bestehen (zit. nach 13), was bei Gewebs- und Organtransplantationen von Bedeutung werden könnte.

| Antigen                             | ungefähre<br>Phänotyp-<br>frequenz | Indikator-<br>system       | entdeckt von                         |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| DUZO                                | 22                                 | Antihuman-<br>glob. - Test | MOULINIER 57 (22)                    |
| Ko <sup>a</sup>                     | 21                                 | Aggl. - Test               | v. D. WEERDT 61 (33)                 |
| Ko <sup>b</sup>                     | 60                                 | "                          | v. d. WEERDT 65 (32)                 |
| Zw <sup>a=P1</sup> A <sup>1=I</sup> | 97                                 | "<br>C' -Fixation          | v. LOGHEM 59 (18)<br>SHULMAN 61 (25) |
| Zw <sup>b=P1</sup> A <sup>2</sup>   | 26                                 | Aggl. - Test               | v. d. WEERDT 63 (34)                 |
| P1GrLy <sup>B1=II</sup>             | 46                                 | C' -Fixation               | ASTER 61 (4)                         |
| P1GrLy <sup>C1</sup>                | 30                                 | "                          | SHULMAN 62 (26)                      |
| P1 <sup>E1</sup>                    | 99,9                               | "                          | SHULMAN 62-64 (27)                   |
| P1 <sup>E2</sup>                    | 5                                  | "                          | "                                    |
| III                                 | 26                                 | "                          | ASTER et al. 64 (1)                  |
| IV                                  | 8                                  | "                          | "                                    |
| V                                   | 22                                 | "                          | "                                    |
| VI                                  | 46                                 | "                          | "                                    |
| VII                                 | 3                                  | "                          | "                                    |

Tab. 1 : Bisher bekannte Plättchengruppen

### III. Untersuchungsmöglichkeiten

Die Methoden, die zur Untersuchung der Blutplättchenantigene und ihrer Antikörper verwendet wurden, haben sich als unterschiedlich brauchbar erwiesen.

#### 1. Die Plättchenagglutination

Die Methode, die von VAN LOGHEM (18) und von VAN DER WEERDT (33) angewandt wurde, ist nicht sehr sensibel. Da man frische Blutplättchen dazu braucht, ist sie nicht zur Durchuntersuchung größerer Sammlungen von - notwendigerweise gelagerten - Zellen geeignet. Es hat sich überdies gezeigt, daß auch normales menschliches Serum häufig Plättchen agglutiniert.

(1) Die Methode ist aber die einzige, mit der Anti - P1<sup>A2</sup> positive Ergebnisse zeigte.

#### 2. Der Antiglobulin - Konsumptions - Test

Der Test beruht darauf, daß mit Antikörpern beladene Thrombozyten aus einem Serum weitere Antikörper aufnehmen, die gegen menschliches Globulin gerichtet sind, und damit den Titer dieses Anti-Humanglobulin-Serums senken. Die Methode verlangt hohe Antikörpermengen und frische Zellen. Mit ihr entdeckte MOULINIER (22) das Antigen DUZO. Der Test zeigt große Variationen bei geringen Änderungen in der Durchführung und ergibt mit den meisten Thrombozytenantikörpern nur schwach positive oder negative Resultate. (28)

#### 3. Die Verhinderung der Blutkuchenretraktion

Außer Anti-P1<sup>A1</sup> haben die Plättchenantikörper nicht die Fähigkeit, die Retraktion des Blutkuchens vollständig zu verhindern (1, 28).

#### 4. Plättchenlysis

ASTER hat mit dem von ZUCKER beschriebenen Test gute Erfolge erzielt (1).

#### 5. Der Komplementbindungs-Test

Der von ASTER (1) und SHULMAN (25) angewendete Test ist verhältnismäßig sensibel und neben der Plättchenlysis der einzige Test, der sich als ausreichend reproduzierbar erwiesen hat. Er hat für die Untersuchungen an Thrombozytenantikörpern große Bedeutung gewonnen. Mit ihm zeigen die meisten Antikörper positive Ergebnisse, und es können auch inkomplette Antikörper erfaßt werden, die mit den Reaktionen komplementbindender Antikörper interferieren (1, 28). Der Test eignet sich auch zur Untersu-

## chung von gelagerten Plättchen.

### IV. Chemische und physikalische Eigenschaften der Thrombozytenantigene und ihrer Antikörper

---

Alle Thrombozytenantikörper sind 7 S-Gammaglobuline.

P1<sup>A1</sup> und P1GrLy<sup>B1</sup>, P1GrLy<sup>C1</sup>, P1<sup>E1</sup> und P1<sup>E2</sup> sind Oberflächenantigene, die mit der Stromafraktion lysierter Zellen verbunden sind.

Durch Erhitzen auf 56°C, durch Inkubieren bei pH 3 oder 10 bei 20°C für 30 Min., durch Einfrieren oder Lyophilisieren wird die Kapazität der Plättchen, Antikörper zu adsorbieren, nicht gestört.

Trypsin in hoher Konzentration inaktiviert P1<sup>A1</sup> nicht. P1<sup>A1</sup> konnte nicht in löslicher Form aus Zellen gewonnen werden.

Bis jetzt ist die chemische Natur der Plättchen-Antigene noch ungeklärt, man glaubt jedoch, daß sie wie die Erythrozytenantigene (28) Polysaccharide sein könnten.

### V. Genetische Untersuchungen an Plättchenantigenen

---

#### 1. Vererbung spezifischer Antigene:

ASTER (3) untersuchte 15 Familien mit Hilfe spezifischer komplementbindender Antikörper auf die Erbllichkeit von Plättchenantigeneigenschaften. Besaßen beide Eltern das Antigen, so fand es sich bei 100 % der Kinder, besaß nur ein Elternteil das Antigen, so zeigten es die Kinder in etwa 50 %. Fehlte das Antigen bei beiden Eltern, so kam es auch bei den Kindern nicht vor. Daraus folgt, daß die Antigeneigenschaften der Blutplättchen genetisch kontrolliert und dominant vererbt werden.

#### 2. Gendosis - Effekte

Bei der Bestimmung des Phänotyps von Blutplättchen mit Anti-P1<sup>A1</sup> stellte SHULMAN (28) fest, daß die untersuchten Plättchen zwei Gruppen bildeten, die sich durch die Menge des gebundenen Komplements unterschieden. Ein Teil der Thrombozyten band annähernd doppelt soviel Komplement als die anderen. Studien an Familien, die ein wenig reaktives Elternteil und hochreaktive Kinder hatten, ließen vermuten, daß die Ausprägung des Antigens durch ein alleles Genpaar kontrolliert wird, welches bei Homozygotie (= doppelte Gendosis) hochreaktive Plättchen bewirkt, bei Heterozygotie (= einfache Gendosis) schwachreaktive. Später fand SHULMAN bei Untersuchungen mit dem von VAN DER WEERDT entdeckten Anti-P1<sup>A2</sup>, daß

dieser Antikörper mit den Zellen von  $P1^{Al}$ -negativen Individuen und mit Zellen von Individuen, die als heterozygot bezeichnet worden waren, reagierte, nicht aber mit Zellen von Individuen, die aufgrund ihrer starken Aktivität als homozygot in bezug auf  $P1^{Al}$  bezeichnet worden waren. Ursprünglich vermutete SHULMAN, daß auch bei  $P1GrLy^{Bl}$  Homozygotie mit vermehrter Komplementbindung einhergehe. Die quantitativen Untersuchungen an 27 Individuen ergaben jedoch ein Kontinuum von Werten bis zur annähernd zweifachen Menge des zumindest gebundenen Komplements.

## VI. Pathophysiologie der komplementbindenden Antikörper

### 1. Quantitative Verhältnisse

SHULMAN benutzte zur experimentellen Induktion von Thrombozytopenie antikörperhaltiges Plasma in Anfangsdosen von nicht über 0,12 ml/kg Körpergewicht, das im Laufe von 30 Min. infundiert wurde. Tritt eine Zellverminderung von weniger als 20 % auf, so kann die Dosis ohne Gefahrnach 24 Std. verdoppelt werden (28).

In den von SHULMAN verwendeten Dosen verursachte keiner der getesteten Antikörper ( $P1^{Al}$ ,  $P1GrLy^{Bl}$  und  $P1^{El}$  der Tabelle 1) eine Verlängerung der Blutungszeit, Petechien oder subjektive Beschwerden, außer Anti- $P1GrLy^{Bl}$ , der ein leichtes Fieber erzeugte.

Die Wirkung von komplementbindenden und inkompletten Antikörpern in vivo ist dieselbe, wenn sie in Dosen gegeben werden, die sich in vitro als äquivalent erwiesen haben. Eine Verminderung von Zellen kann in vivo mit einer Antikörperkonzentration erhalten werden, die zehnfach geringer ist als die minimale Konzentration, die in vitro noch wirksam ist. Auch ASTER (2) beschreibt, daß durch eine Antikörperkonzentration, die mit in vitro - Technik nicht festgestellt werden konnte, in vivo eine Plättchenzerstörung, verbunden mit Leukopenie und pyrogenen Reaktionen, auftrat. SHULMAN berichtet weiter, daß die Zahl der Antikörper, die bei einem Probanden mit  $P1^{Al}$ -Plättchen eine plötzliche und anhaltende Thrombozytopenie erzeugte, 750 Moleküle pro Zelle betrug. An eine Zelle adsorbiert werden kann aber eine viel größere Menge von Antikörpermolekülen. Wenn die Thrombozytopenie eintritt, ist nur etwa 1 % der Antikörperplätze an den Zellen besetzt.

### 2. Überleben transfundierter Plättchen; die Rolle von Milz und Leber bei der von Isoantikörpern hervorgerufenen Thrombozytopenie:

ASTER gab  $^{51}Cr$  - markierte Plättchen der Gruppe  $P1GrLy^{Bl}$  an gesunde

Versuchspersonen, die dieses Antigen nicht besaßen (2). Die Plättchen zeigten normale Überlebenszeit. Darauf injizierte er den Probanden Anti-PIGr Ly<sup>B1</sup> in kleinen Dosen mit dem Erfolg, daß die Plättchen schneller als normal sequestriert wurden ( $t/2 = 160$  Min. Statt 9 - 11 Tage). Gleichzeitig stellte er ein Ansteigen der Radioaktivität in der Milzgegend fest, während die Leberregion keine Besonderheiten zeigte. Bei Antikörpergaben, die 8 - 10 mal größer waren, erwies sich die Thrombozytenüberlebenszeit als noch mehr verkürzt ( $t/2 = 15$  Min.), und die Aktivität war besonders im Leberbereich gesteigert. Das bedeutet, daß wenig sensibilisierte Plättchen in der Milz, hochsensibilisierte aber vor allem in der Leber abgebaut werden. SHULMAN beschreibt dasselbe Phänomen (28). Er führt auch an, daß man bei splenektomierten Individuen eine 5 - 7-fach größere Antikörperdosis als bei normalen Individuen braucht, um eine Thrombozytopenie hervorzurufen.

## VII. Die Bedeutung der Antikörperbildung für die Klinik

### 1. Isosensibilisierung durch Transfusionen:

BOSCH et al. (6) berichten über graduelle Isosensibilisierung bei drei Patienten mit schwerer Thrombopenie, bei denen schließlich jede Substitution versagte.

Bei den von ASTER (3) untersuchten 172 mehrfach Transfundierte fand bei 15 (= 8,7 %) eine Isoimmunisierung mit nachweisbarer Antikörperbildung statt. Dabei hatten die Patienten, die keine Antikörperbildung zeigten, durchschnittlich 25 Transfusionen, solche, die Antikörper gebildet hatten, 41 Transfusionen erhalten. Patienten, die Antikörper bildeten, hatten signifikant mehr Vollblut bekommen als solche, die keine Antikörper bildeten. Für Thrombozytenkonzentrate bestand keine solche Beziehung. Da das verwendete plättchenreiche Plasma wenig Leukozyten enthielt, die Plättchenantigene II - V andererseits an Leukozyten nachgewiesen sind, schloß ASTER, daß die im Vollblut enthaltenen Leukozyten die Antikörperbildung hervorrufen, und daß diese Antikörper dann Kreuzreaktionen mit Blutplättchen eingehen.

Die meisten Patienten zeigten Antikörperbildung gegen mehrere Antigene. Am häufigsten waren Antikörper gegen V.

14 von 15 Patienten, die Antikörper entwickelten, litten an hämatologischen Erkrankungen (7 an Leukämie, 6 an aplastischer Anämie). Die Antikörperbildung erfolgte bei den Leukämiekranken trotz antileukämischer Be-

handlung, die ja für ihre immunsuppressive Wirkung bekannt ist.

In drei Fällen gelang es ASTER nach Bestimmung der Antikörper, einen geeigneten Spender mit nicht antigenen Plättchen für seine Patienten zu finden. Nicht in allen Fällen, wo die Thrombozytenüberlebenszeit verkürzt ist, können Antikörper nachgewiesen werden (5). SHULMAN (28) fand bei Patienten, bei denen infundierte Plättchen nicht zirkulierten, in 16 von 36 Fällen komplementbindende Antikörper. Die Patienten hatten zwischen 8 und 50 Transfusionen erhalten.

Bei experimenteller Immunisation zeigte nur eines von 6 Individuen schwache Bildung eines Plättchenagglutinins nach der 18. Transfusion von 75 ml Vollblut desselben Spenders (21).

## 2. Transfusionsreaktionen

DAUSSET (11) und CASELL (8) berichten über Patienten, die Unverträglichkeitsreaktionen nach Bluttransfusionen zeigten, die Transfusionen aber gut vertrugen, wenn Plättchen und Leukozyten daraus entfernt worden waren. Die von ASTER untersuchten gesunden Personen zeigten nach Plättchentransfusion und nachfolgender Infusion des entsprechenden Antikörpers (PlGrLy<sup>B1</sup>) schwere fieberhafte Transfusionsreaktionen (2).

Von den 15 mehrfach Transfundierte, bei denen ASTER Antikörper nachwies, zeigten 10 Fieber und Schüttelfrost. Die übrigen 5 hatten keine Transfusionsreaktionen (3).

Zur Erklärung der posttransfusionellen Purpura, bei der ja nicht nur die fremden, sondern auch die eigenen Blutplättchen zerstört werden, zieht SHULMAN einen Vergleich mit dem Mechanismus, der die durch Drogen (z. B. Chinin) verursachte Purpura zu bedingen scheint (28). Dabei nimmt man an, daß die Droge zusammen mit einem Zellbestandteil oder mit einem nicht-zellulären Makromolekül das komplette Antigen bildet, Antikörper, die durch das komplette Antigen hervorgelockt worden sind, können sich auch mit der Droge allein verbinden, und die Anheftung dieses Komplexes an Zellen scheint eine ziemlich unspezifische Adsorption zu sein, die nichts mit zellulären Antigenen zu tun hat. Es ist die Frage, ob eine solche unspezifische Absorption eines AG - AK - Komplexes auch die Ursache für die Purpura nach Transfusionen ist.

In der Literatur sind bisher 5 schwere Fälle von posttransfusioneller Purpura beschrieben worden. Eine Zusammenstellung darüber findet sich bei DAUSSET (13).

## B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN AN MEHRFACH TRANSFUNDIERTEN PATIENTEN

### I. Methodik und Krankengut

#### 1. Durchführung der Versuche

Wir verwendeten einen qualitativen Komplementbindungs-Test nach ASTER (1)

Untersucht wurde das Serum von mehrfach transfundierten Patienten der Münchener Universitätskliniken, des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing, der Münchener Krecke-Klinik und einiger Patienten aus dem Juliusspital und der Universitätsklinik in Würzburg.

Z. T. wurde das benötigte Blut (nach Möglichkeit 30 ml) während des stationären Aufenthaltes der Patienten entnommen, z. T. wurden die Patienten später angeschrieben und gebeten, sich mit einer beigelegten Venüle von ihrem Hausarzt Blut abnehmen zu lassen. Den Seren wurde 0,05 ml 0,1 prozentiges  $\text{NaN}_3$  zugefügt, dann wurden sie eingefroren und bis zum Gebrauch bei  $-25^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Für die Gewinnung von Test-Thrombozyten wurde mit EDTA ungerinnbar gemachtes Blut der Blutgruppe O möglichst bald nach der Abnahme weiter verarbeitet. Zuerst wurden durch 30 Min. langes Zentrifugieren bei 180 g und  $2^\circ\text{C}$  die Blutzellen abgetrennt. Der Überstand, der die Plättchen enthält, wurde 40 Min. bei 1000 g zentrifugiert. Unter den nun abzentrifugierten Plättchen noch vorhandene Erythrozyten wurden mit 1% iger  $\text{NH}_4$ -Oxalatlösung hämolyisiert. dann wurden die Plättchen noch zweimal durch Resuspension in physiologischer Kochsalzlösung und Zentrifugieren von 30 Min. gewaschen.

Zuletzt zählten wir die Plättchen in der Neubauer-Kammer aus und brachten sie durch Verdünnen oder Konzentrieren auf eine Zahl von  $3 \times 10^5 / \text{mm}^3$  NaCl-Lösung. Pro  $10 \text{ cm}^3$  dieser Plättchensuspension wurde 0,05 ml 0,1% iges  $\text{NaN}_3$  zugegeben.

Die Hammelerythrozyten bezogen wir von den Behringwerken. Sie wurden 3 - 4 x in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, in Veronalpuffer suspendiert und durch Messung der optischen Dichte im Fotometer auf eine Zellzahl von  $10^6 / \text{mm}^3$  gebracht (das entspricht einer Dichte von 0,75 mμ). Zur Sensibilisierung wurde der Zellsuspension die gleiche Menge an Hämo-lysin (Behring), dessen günstigste Verdünnung durch Titration bestimmt wurde, langsam unter Schütteln beigegeben. Dann inkubierten wir die Suspen-

sion 30 Min. bei 37°C und bewahrten sie bis zum baldigen Gebrauch bei 5°C auf.

#### Hämolysintitration:

Das Hämolysin wurde 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 mit Veronalpuffer verdünnt. 0,1 ml jeder Lösung wurde auf eine Serie von Teströhrchen verteilt. Dazu gaben wir je 0,2 ml Komplement, 0,4 ml Puffer und 0,1 ml Hammelblut. Nach 30 Min. Inkubation bei 37°C wurde mit 300 g kurz zentrifugiert und das Röhrchen bestimmt, das die erste kleine Menge an unlysierten Zellen enthielt. Diese Verdünnung wurde als eine Hämolysineinheit bezeichnet. Für unsere Versuche benützten wir vier Hämolysineinheiten, d. h. eine Konzentration, die 4 x stärker war als die, bei der gerade noch eine kleine Zahl unlysierter Zellen erhalten blieb.

Das getrocknete Meerschweinchenkomplement wurde von den Hyland Laboratories, Calif./U. S. A., bezogen und für jede Versuchsreihe neu titriert.

#### Komplementtitration:

Das gelöste Komplement wurde 1:20, 1:25 usw. bis 1:45 mit Veronalpuffer verdünnt. 0,05 ml jeder Lösung wurde in eine Reihe von Testgläschen gegeben, dazu 0,5 ml Puffer und 0,1 ml sensibilisierte Schafszellen. Dann wurde 40 Min. bei 37°C inkubiert, kurz bei 300 g zentrifugiert und das Teströhrchen bestimmt, das die erste kleine Menge an nicht hämolysierten Zellen enthielt. Die nächsthöhere Konzentration benutzten wir für die Versuche.

#### Testausführung

Zu Beginn wurden die Seren 30 Min. im Wasserbad bei 56°C erhitzt, um vorhandenes Komplement zu inaktivieren. Wir testeten jedes Serum in einer Verdünnung von 1/2 und 1/8 und mit drei verschiedenen "Pools" aus je drei Thrombozytensuspensionen von verschiedenen Spendern. Ein Pool enthielt je  $3 \times 10^5$  Thrombozyten von jeder Suspension pro  $\text{mm}^3$ , im ganzen also  $9 \times 10^5$  Plättchen. Nach ASTER liegt nämlich das Optimum der Plättchenzahl antigener Plättchen für den Versuch zwar bei  $3 \times 10^5$ , jedoch beeinflussen nicht antigene Plättchen das Ergebnis nicht.

Die Reagentien wurden tropfenweise verwandt. Dazu benutzten wir Pasteurpipetten, die einen reproduzierbaren Tropfen von 0,05 ml liefern.

## Versuchsanordnung

1. Röhrchen: 3 Trpf. Puffer + 3 Trpf. Serum (= Serumverdünnung 1/2)
2. " 1 Trpf. aus 1. + 1 Trpf. von Pool I + 1 Trpf. C'
3. " " + 1 Trpf. von Pool II + 1 Trpf. C'
4. " " + 1 Trpf. von Pool III + 1 Trpf. C'
5. " " + 1 Trpf. Puffer + 1 Trpf. C' (= Serumkontrolle)
6. " 7 Trpf. Puffer + 1 Trpf. Serum (= Serumverdünnung 1/8)
7. " 1 Trpf. aus 6. + 1 Trpf. von Pool I + 1 Trpf. C'
8. " " + 1 Trpf. von Pool II + 1 Trpf. C'
9. " " + 1 Trpf. von Pool III + 1 Trpf. C'
10. " " + 1 Trpf. Puffer + 1 Trpf. C' (= Serumkontrolle)

C' = Komplement

Nach Zugabe des Komplements wurden die Gläschen geschüttelt und 90 Min. bei 37°C inkubiert. Danach fügten wir 0,5 ml Puffer und 0,1 ml sensibilisierte Hammelerythrozyten zu und inkubierten die Röhrchen unter mehrmaligem Schütteln noch einmal 40 Min. bei 37°C. Das Ergebnis Hämolyse - keine Hämolyse wurde nach kurzem Zentrifugieren der Testgläschen bei 300 g direkt abgelesen. Dabei bedeutet:

Hämolyse der Erythrozyten: Es wurde kein Komplement gebunden, das Patientenserum enthielt keine komplementbindenden Antikörper.

Keine Hämolyse: Das vorhandene Komplement wurde durch Antikörper gebunden.

Außer der Serumkontrolle, die zur Prüfung dient, ob das Serum antikomplementär ist, d. h. die Fähigkeit zu unspezifischer Bindung von Komplement hat, wurden bei jeder Versuchsreihe noch Plättchenkontrollen und Kontrollen des Komplements und der Erythrozyten durchgeführt.

Plättchenkontrolle: (3 x für die verschiedenen Pools):

1 Tropfen Puffer

1 Tropfen Thrombozyten

1 Tropfen C'

Nach Zugabe von Puffer und sensibilisierten Zellen muß Hämolyse auftreten, da C' nicht vorher gebunden wird.

Komplementkontrolle:

2 Tropfen Puffer

1 Tropfen C'

Nach Zugabe von Puffer und sensibilisierten Zellen muß Hämolyse auftre-

ten.

### Erythrozytenkontrolle:

#### 3 Tropfen Puffer

Bei Zugabe von sensibilisierten Zellen darf keine Hämolyse auftreten, da kein Komplement vorhanden ist.

## 2. Krankengut

Die 100 untersuchten mehrfach transfundierten Patienten hatten zwischen 6 und 314, im Durchschnitt 34,2 Transfusionen zu je 500 ml erhalten. 49 Patienten hatten nur Vollblut bekommen, 43 gewaschene Erythrozyten und Vollblut, 7 Thrombozytenkonzentrate und Vollblut und einer gewaschene Erythrozyten, Thrombozytenkonzentrate und Vollblut.

Wir wählten für unsere Untersuchungen nach Möglichkeit Patienten, bei denen die Transfusionen in wiederholten kleineren Mengen (nicht mehr als 500 ml) während eines längeren Zeitraumes gegeben worden waren, sodaß man mit einer verhältnismäßig langen Sensibilisierungsdauer rechnen konnte. So waren bei 67 von unseren Patienten die Transfusionen über einen Zeitraum verteilt, der größer war als zwei Monate. Bei den übrigen 31 waren die Transfusionen im Durchschnitt während 23 Tagen gegeben worden. 6 Patienten davon, bei denen Herzoperationen mit extrakorporalem Kreislauf durchgeführt wurden, hatten die Transfusionen während kurzer Zeit vor und nach der Operation und zur Auffüllung der Herzlungenmaschine erhalten. 7 Patienten hatten die Transfusionen im Laufe einer Dauerdialysebehandlung bekommen. Pro Hämodialyse benötigt man 100 ml Blut zur Auffüllung des Geräts. Außerdem erhalten die Patienten im Anschluß an die Dialyse meist noch eine Transfusion.

Hinsichtlich der Art der Erkrankung wurde keine besondere Auswahl getroffen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Art und Verteilung der Erkrankungen und über die dabei durchschnittlich gegebenen Transfusionen.

| Art der Erkrankung                                                                              | Zahl der Patienten | Durchschnittl. Zahl der erhaltenen Transfusionen |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|
| <u>Erkrankungen des Knochenmarks und der blutbildenden Organe</u><br><u>(insgesamt 40 Pat.)</u> |                    |                                                  |
| Aplast. Anämien, Panmyelopathien                                                                | 10                 | 32,3                                             |
| Osteomyelosklerosen                                                                             | 5                  | 25,4                                             |
| Akute Leukämien                                                                                 | 9                  | 23,9                                             |
| Chronische myeloische Leukämien                                                                 | 7                  | 20,9                                             |
| Myelo - Sarkomatose                                                                             | 1                  | 11                                               |
| Thrombopenien allerg. tox. Genese                                                               | 3                  | 20                                               |
| Plasmozytome                                                                                    | 3                  | 11,7                                             |
| Chronische lymphatische Leukämien                                                               | 2                  | 43,5                                             |
| <u>Anämien verschiedener Genese</u><br><u>(37 Pat.)</u>                                         |                    |                                                  |
| Hämolytische Anämien                                                                            | 5                  | 26                                               |
| Blutungsanämien (M. Osler, Hämophilien, Colitis ulcerosa, Ulcusblutungen)                       | 18                 | 61,2                                             |
| Carzinom - Anämien                                                                              | 4                  | 17,2                                             |
| Nephrogene Anämien                                                                              | 6                  | 24,2                                             |
| Unklare bzw. gemischte Formen                                                                   | 4                  | 24                                               |
| <u>Chirurgische Erkrankungen</u><br><u>(insges. 16 Pat.)</u>                                    |                    |                                                  |
| Herzoperationen                                                                                 | 6                  | 21                                               |
| andere                                                                                          | 10                 | 17,1                                             |
| <u>Dauerdialyse - Patienten</u>                                                                 | 7                  | ca. 120<br>(=64 Dialysen)                        |

Tab. 2 : Zusammensetzung des Krankenguts

## II. Ergebnisse

### 1. Häufigkeit der Antikörperbildung

Von den 100 untersuchten Seren waren 5 antikomplementär, d. h. sie zeigten eine unspezifische Adsorption von Komplement und waren deshalb für den Test nicht geeignet.

Unter den übrigen 95 Patientenseren waren 7, die komplementbindende Antikörper gegen Thrombozyten enthielten.

Die im Vergleich zu ASTER's Untersuchungen (3) geringere Prozentzahl (7,2 % gegenüber 8,7 %) mag sich einmal aus dem verhältnismäßig kleinen Kollektiv erklären. Andererseits spielen sicher auch der Zeitraum, während dem die Transfusionen gegeben wurden und der Zeitabstand zwischen der Verabreichung der Transfusionen und der Serumentnahme eine Rolle. Untersuchungen in unserem Institut haben nämlich ergeben, daß bei zunächst antikörperpositiven Schwangeren manchmal schon wenige Wochen nach der Entbindung keine Antikörper mehr nachgewiesen werden können.

Bei unseren Untersuchungen an Polytransfundenen war es leider nicht immer möglich, die Patienten zur Nachuntersuchung und Serumentnahme zu bewegen, solange gegebenenfalls noch ein hoher Antikörpertiter zu erwarten war. So gelang es nur bei 72 Patienten, das Serum innerhalb von 12 Wochen nach der letzten Transfusion abzunehmen, was noch ein einigermaßen günstiger Zeitraum wäre, wenn man annimmt, daß die letzte Transfusion zu einem Booster-Effekt geführt habe. (Die Halbwertszeit für den Abbau von  $\gamma$ -Globulinen beträgt bis zu 33 Tage (16)).

Bei ASTER finden sich keine Angaben über die zeitlichen Verhältnisse von Transfusionsgaben und Serumentnahme.

## 2. Antikörperpositive Patienten

| Patient                | I            | II                          | III             | IV                 | V                  | VI                        | VII            |
|------------------------|--------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------------|----------------|
| Zahl der Transfusionen | 100          | 95                          | 21              | 24                 | 112D               | 28                        | 24             |
| Art                    | VB GE        | VB GE                       | nur VB          | VB GED             | VB GE              | nur VB                    | VB             |
| Transfusionsbehandlung | 1953-Okt. 65 | Okt. 64-Juli 65             | Jan. 65-Jan. 66 | Jan. 65-Juni 65    | Mai 65-Aug. 66     | Juli 64-Juli 65           | 1946-1966      |
| Reaktionen             | ja           | Schweißausbruch<br>Übelkeit | -               | -                  | Fieber             | Urticaria                 | ja             |
| Zahl der Serumproben   | 4            | 3                           | 1               | 1                  | 5                  | 5                         | 2              |
| davon positiv          | 3            | 3                           | 1               | 1                  | 1                  | 5                         | 2              |
| negativ                | 1            | 0                           | 0               | 0                  | 4                  | 0                         | 0              |
| Diagnose               | Morbus Osler | Aplast. Anämie              | Akute Leukämie  | Niereninsuffizienz | Niereninsuffizienz | Erworben. hämolyt. Anämie | Aplast. Anämie |

VB = Vollblut

GE = Gewaschene Erythrozyten

D = Hämodialyse

Tab. 3 : Antikörperpositive Patienten

### 3. Reaktionsbreite der gefundenen Antikörper

Die Seren, die bei der Testung mit "Pools" ein positives Ergebnis gezeigt hatten, wurden anschließend gegen eine Reihe von verschiedenen Thrombozytensuspensionen einzeln getestet.

Dabei zeigte Patient

|     |                                                            |   |   |    |   |                |
|-----|------------------------------------------------------------|---|---|----|---|----------------|
| I   | Positive Ergebnisse mit 19 von 40 Suspensionen ( = 47,5 %) |   |   |    |   |                |
| II  | "                                                          | " | " | 39 | " | 50 ( = 78 %)   |
| IV  | "                                                          | " | " | 19 | " | 43 ( = 44,4 %) |
| V   | "                                                          | " | " | 14 | " | 49 ( = 28,6 %) |
| VI  | "                                                          | " | " | 8  | " | 50 ( = 16 %)   |
| VII | "                                                          | " | " | 22 | " | 50 ( = 44 %)   |

Von Patient III war zu wenig Serum vorhanden, um eine größere Anzahl von Thrombozytensuspensionen zu testen.

Die obigen Werte sind nicht gleichbedeutend mit der Phänotypfrequenz eines bestimmten Antigens, da wahrscheinlich in den einzelnen Seren Antikörpermische vorliegen.

### III. Kasuistik der antikörperpositiven Patienten

Patient I, ♂, geb. 25.7.03

Morbus Osler

Seit seinem 50. Lebensjahr (1953) hatte er häufig langanhaltendes Nasenbluten. Die Blutungsneigung verstärkte sich noch seit Januar 1965. Im Juni 1965 sollte zur Behebung der Epistaxis eine Nasenoperation in der Münchener Universitätspoliklinik vorgenommen werden. Vor der Operation sollte in der Medizinischen Klinik der Gerinnungsstatus überprüft werden.

#### Aufenthalt in der Med. Univ. Klinik

Bei der Aufnahme in die klinische Behandlung hatte der Patient eine Anämie von 2,72 Mill. Ery, 7,4 g% Hgbl. Die Thrombozytenwerte waren normal.

Bei drei Serumuntersuchungen zwischen Juni und September 65 konnten antithrombozytäre Antikörper nachgewiesen werden, während eine Serumprobe vom Okt. 65 negative Ergebnisse zeigte.

Der Patient hatte über 100 Bluttransfusionen erhalten, 45 davon seit Beginn des Jahres 1965. In unserer Klinik konnten wir beobachten, daß der Patient bei Vollbluttransfusionen Unverträglichkeitsreaktionen zeigte, während er Transfusionen von leukozytenarmen Thrombozytenkonzentraten gut vertrug. Das stimmt mit der Beobachtung von SHULMAN überein (28), wonach fieberhafte Reaktionen, Kopfweh und Tachykardie vor allem bei antikörperbedingter Leukozytenzerstörung auftreten, wobei dieselben Antikörper auch mit Blutplättchen reagieren können, da in einigen Fällen eine Antigenge-meinschaft zwischen Plättchen und Leukozyten besteht. (Siehe PlGrLy<sup>BI</sup>), PlGrLy<sup>C1</sup>, III - V der Tabelle 1) Zu erwähnen ist noch, daß der Patient während seines ganzen Aufenthaltes normale Thrombozytenwerte aufwies.

Patient II, ♂, geb. 17.5.12

### Aplastische Anämie

Der Patient litt seit einer Appendektomie im Jahre 1955 unter Müdigkeit, Kopfweh, Schweißausbrüchen und Schwindelanfällen.

1958 bemerkte er ein gelbliches Hautkolorit. 1962 bis 1964 war er wiederholt in verschiedenen Krankenhäusern zur stationären Behandlung, wo zuerst der Verdacht auf eine diffuse Reticulose geäußert wurde, dann eine Anämie mit Lebersiderose, eine sideroachrestische Anämie und eine aplastische Anämie mit nur sekundärer Siderose vermutet wurden. 1964 bekam der Patient außerdem zerebrale Anfälle und Herzbeschwerden.

Im Laufe der Zeit bekam der Patient über 70 Transfusionen, zuletzt als gewaschene Erythrozyten, da er Unverträglichkeitsreaktionen zeigte.

Er wurde mit Decortin, Testoviron, Zentropil und Lanicor behandelt. Die Thrombozytenwerte waren während dieser Zeit normal.

Am 26.1.65 wurde er in die Med. Univ. Klinik eingewiesen.

#### Aufenthalt in der Med. Univ. Klinik:

Laborwerte bei der Aufnahme: Leuko 10 000, davon 11 % Eos.

Alk. Leukozytenphosphatase 134

Hgbl. 4,2 g%

Ery 1,1 Mill.

Thrombo 138 000

Bei der Fahndung nach einem Thymom als Ursache für eine aplastische Anämie fand man im Röntgenbild eine Verschattung im vorderen Mediastinum, die sich aber später deutlich verkleinerte, wie die Verlaufskontrollen zeigten.

Bei einer Myelotomie (Darmbeinkamm) fand man eine myeloische Insuffizienz, die ausschließlich die Erythropoese betraf. Eine beginnende Reticulo-Endotheliose konnte nicht ausgeschlossen werden, ebenso wenig wie eine chronisch-hyperergische Knochenmarksreaktion, u. U. als Folge einer Sensibilisierung durch Tumoreiweiß.

Als die Thrombozytenwerte im Mai 1965 nach einer Vollbluttransfusion von 223 000 auf 136 000 fielen, wurde ein Test auf Thrombozytenantikörper durchgeführt, der ein positives Ergebnis zeigte, ebenso wie zwei weitere Serumproben. Der Patient erhielt in der Folge nur noch gewaschene Erythrozyten. Die Thrombozytenwerte hielten sich dabei zwischen 150 000

und 250 000.

Im Herbst kam der Patient erneut wegen einer Hepatitis zur Aufnahme. Ein Leberpunktat zeigte ausgedehnte schwerste Leberzellnekrosen. Am 3. 12. 65 verstarb der Patient im Leberkoma. Sektion wurde nicht durchgeführt.

Patient III, ♀, geb. 17.12.45

### Akute Leukämie

Die Patientin litt seit 1964 unter Müdigkeit und Kopfweg. Sie hatte häufig Petechien und Zahnfleischblutungen. Im Januar 1965 wurde sie wegen zunehmender Anämie zur Abklärung der Diagnose in die Medizinische Universitätsklinik München eingewiesen, nachdem sie in einem auswärtigen Krankenhaus eine Bluttransfusion erhalten hatte.

#### Aufenthalt in der Med. Univ. Klinik:

Aufgrund der klinischen Untersuchungen wurde bei der Patientin die Diagnose einer akuten Leukämie gestellt. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über das Verhalten der Blutwerte im Verlauf der Therapie:

|          | Leuko | Hglb  | Ery  | Thrombo | Therapie                       |
|----------|-------|-------|------|---------|--------------------------------|
| 12.1.65  | 4700  | 7,9   | 2,66 | 37 000  | Urbason Purinethol             |
| 15.2.65  | 3900  | 13,8  | 4,6  | 18 000  | " " 10 x VB                    |
| 26.3.65  | 4550  | 11,2  | 3,0  | 108 000 | " "                            |
| Juni 65  | 8450  | norm. | 4,5  | normal  | intermittierend Oncovin        |
| Sept. 65 | 3600  | 10,4  | 3,5  | normal  | " " +2 x VB                    |
| 9.11.65  | 22000 | 11,8  | 3,2  | 9 000   | Urbason Purinethol Methotrexat |
| 1.12.65  | 3300  | 11,5  | 3,4  | 4 000   | " " +10 x VB                   |
| 18.1.66  | 4300  | 10,8  | 3,5  | 167 000 | "                              |

Tab. 4 : Verhalten der Blutbefunde bei akuter Leukämie (Pat. III)

Die antikörperpositive Serumprobe entnahmen wir am 3.1.66. Von diesem Zeitpunkt liegen leider keine Thrombozytenwerte vor, doch ist bemerkenswert, daß 14 Tage später die Werte annähernd normal waren. So müssen die niedrigen Thrombozytenwerte im November und Dezember 1965 wohl auf die Medikation von Purinethol zurückgeführt werden, die im Dezember ab-

gesetzt wurde, wobei allerdings auffällig ist, daß die Erythrozytenwerte und die Leukozytenzahlen sich unter der Purinetholmedikation nicht auf stark subnormale Werte verringerten.

Patient IV, ♀, geb. 5.3.58

Niereninsuffizienz bei chronischer Glomerulonephritis

Außer leichten Tonsillitiden hatte die Patientin keine Vorkrankheiten. Seit 1963 litt sie unter Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Bei einer Strumaooperation wurde ein Hypertonus und eine Proteinurie festgestellt. Unter der Diagnose einer chronischen Glomerulonephritis mit Niereninsuffizienz wurde die Patientin im Januar 1965 in die Medizinische Universitätsklinik eingewiesen.

Aufenthalt in der Med. Univ. Klinik:

Die Patientin wurde u. a. mit Hämodialysen und Bluttransfusionen behandelt. Insgesamt erhielt sie 24 x 500 ml.

Im März zeigte die Patientin eine Thrombopenie von 88 000. Die antikörperpositive Serumprobe wurde im Juni entnommen. Die Patientin verstarb, bevor weitere Thrombozytenkontrollen und Serumproben abgenommen wurden.

Transfusionsreaktionen traten keine auf.

Patient V, ♀, geb. 20.9.32

### Niereninsuffizienz bei chronischer Glomerulonephritis

Bei der Patientin ist seit 1963 eine chronische Glomerulonephritis bekannt.

#### Aufenthalt in der Med. Univ. Klinik:

Seit Mai 1965 kommt die Patientin wöchentlich 1 - 2 x zur Hämodialyse in die Klinik.

Eine Serumprobe im Juli 65 zeigte ein negatives Ergebnis in bezug auf Thrombozytenantikörper. Eine Serumprobe vom 11.10.65 war positiv, während drei weitere Serumproben vom März und Juli 66 wieder negativ waren.

Die Patientin hatte gelegentlich nach der Dialyse leichtes Fieber. Die Thrombozytenwerte waren nie auffällig.

Patient VI, ♀, geb. 26.12.03

### Erworbene hämolytische Anämie

Die Patientin hatte im Jahre 1946 eine Gelbsucht. Seitdem litt sie immer wieder unter Mattigkeit und hatte zeitweise gelb gefärbte Skleren. Im März 1964 wurde sie wegen Verdacht auf Hepatitis in ein auswärtiges Krankenhaus eingewiesen.

Dort wurden Anämie und ein Milztumor festgestellt. Im Juli kam die Patientin erneut wegen schlechten Allgemeinzustandes zur stationären Aufnahme. Sie erhielt mehrere Bluttransfusionen und wurde dann zur Klärung der Diagnose nach München überwiesen.

#### Aufenthalt in der Med. Univ. Klinik:

Laborwerte Aug. 64: HgIb. 38 %

Ery 1,76, Retikulozyten 196 ‰

Thrombo 126 000

Leuko leicht erniedrigt

Ery-Überlebenszeit 15 Tage

Race-Coombs-Test direkt: stark positiv

Aufgrund der Laborwerte und der klinischen Untersuchungen wurde die Diagnose einer erworbenen hämolytischen Anämie gestellt. Die Patientin wurde mit Cortison behandelt und erhielt mehrere Bluttransfusionen. Nach der 5. Transfusion mit Vollblut trat eine Urticaria auf.

Im Juni 1965 kam die Patientin erneut zur stationären Aufnahme. Sie zeigte eine mäßige Anämie und normale Leukozytenwerte. Die Thrombozyten wurden nur 2 x bestimmt (23 000 und 33 000).

Die Patientin erhielt wieder Cortison und 8 x 500 ml Vollblut. Sie zeigte keine Reaktionen. (Die erste Transfusion erhielt die Patientin am 9.6.; an diesem Tag wurden die Thrombozyten mit 23 000 bestimmt. Es ist jedoch anzunehmen, daß die Thrombozytenbestimmung vor der Transfusion vorgenommen wurde, und der niedrige Wert nicht auf die Transfusion zurückgeht.) In Anbetracht der niedrigen Thrombozytenwerte hatte die Patientin nur eine verhältnismäßig geringe Blutungsneigung. Eine Leberpunktion ergab keinen Anhalt für einen Leberzellschaden. Am 30.7.65 wurde die Patientin wieder entlassen.

Auf unsere schriftliche Bitte an den Hausarzt der Patientin (am 23.9.65), erhielten wir am 1.2.66 eine Serumprobe zugeschickt, in der sich anti -

thrombozytäre Antikörper nachweisen ließen. Die Patientin wurde daraufhin noch 4 x zur Nachuntersuchung einbestellt und zeigte immer positive Ergebnisse.

Da bei einer erworbenen hämolytischen Anämie nahelag, daß die vorhandenen antithrombozytären Antikörper auch Auto-Antikörper seien, wurde das Serum der Patientin auch mit eigenen Thrombozyten getestet. Das Ergebnis war negativ.

Patient VII, ♀, geb. 10.1.18

### Aplastische Anämie

Die Patientin litt seit 1946 an Blutarmut und erhielt bis Januar 1966 24 Bluttransfusionen, und zwar meist von ihrem Ehemann. Bei der 21. Übertragung von ihrem Mann zeigte die Patientin Transfusionsreaktionen. Die Patientin hatte zwei normale Geburten.

1946 - 1953 wurde sie mehrmals gynäkologisch operiert, 1953 erfolgte eine Ovariectomie, 1954 die Operation eines Bridenileus.

Die Patientin leidet außerdem seit 1955 an einer Hyperthyreose, die mit Propylcil behandelt wird.

Bei der Patientin sind Allergien gegen Tomaten, Erdbeeren etc. bekannt.

#### Ambulante Untersuchung in der Med. Univ. Klinik:

Bei einer ambulanten Untersuchung der Patientin im März 1966 wurden eine idiopathische aplastische Anämie und antithrombozytäre Isoantikörper festgestellt. Die Thrombozytenwerte betrugen 31 000. Der Fall ist insofern bemerkenswert, als hier die Sensibilisierung offensichtlich erst nach der 21. Transfusion mit Blut von demselben Spender auftrat.

#### IV. Diskussion

Abhängigkeit der Sensibilisierung von Anzahl und Art der Transfusionen

Betrachten wir die antikörperpositiven Patienten und vergleichen sie mit dem Kollektiv, so fällt zunächst auf, daß durchaus nicht alle positiven Patienten zu denen gehören, die am meisten transfundiert wurden. 4 von den positiven Patienten, das ist mehr als die Hälfte, hatten sogar weniger Transfusionen als der Durchschnitt erhalten. Ebenso ist es andererseits bemerkenswert, daß bei 16 Patienten, die erheblich mehr Transfusionen erhalten hatten als der Durchschnitt, nämlich  $41 - 314 \times 500$  ml, keine Antikörper nachgewiesen werden konnten. Darunter sind auch drei Dauerdialyse-Patienten, die etwa ein Jahr lang jede Woche fremdes Blut erhielten.

Dabei muß man sich jedoch immer vor Augen halten, daß die Zahl der vorhandenen Antikörper sicher größer ist als die Zahl der nachgewiesenen.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Verteilung der antikörperpositiven Patienten im Kollektiv in Zusammenhang mit der Anzahl der erhaltenen Transfusionen.

Inwieweit die Art der Transfusionen bei der Sensibilisierung eine Rolle spielt, können wir anhand unseres Kollektivs nicht beurteilen, da alle Patienten Vollblut erhalten hatten, und die Anzahl der Konserven mit gewaschenen Erythrozyten und Thrombozytenkonzentraten bei den einzelnen Patienten nur einen geringen Anteil der Transfusionen ausmacht.

|                           |        |         |         |          |          |
|---------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| Zahl d. Pat.              | 28     | 31      | 22      | 11       | 8        |
| Zahl der<br>Transfusionen | 6 - 15 | 16 - 25 | 26 - 40 | 41 - 100 | über 100 |
| Durchschnitt              | 11,2   | 19,5    | 31,1    | 60,6     | 170,5    |
| AK - positiv              | 0      | 3       | 1       | 1        | 2        |
| %                         | 0      | 9,7     | 4,5     | 9,1      | 25       |
| Reaktionen:               |        |         |         |          |          |
| +                         | 2      | 8       | 8       | 5        | 5        |
| %                         | 7,1    | 25,8    | 36,4    | 45,4     | 62,5     |
| -                         | 21     | 19      | 11      | 3        | 3        |
| %                         | 75     | 61,3    | 50      | 27,3     | 37,5     |
| fraglich                  | 5      | 4       | 3       | 3        | 0        |
| %                         | 17,9   | 12,9    | 13,6    | 27,3     | 0        |

Tab. 5 : Verteilung der positiven Patienten im Kollektiv in Zusammenhang mit der Anzahl der Transfusionen

Abhängigkeit der Sensibilisierung von der immunologischen Reaktionslage:

Es wäre nun zu überlegen, ob bei den antikörperpositiven Patienten im Gegensatz zum Kollektiv eine besondere allergische Diathese bestand. Betrachten wir daraufhin unser Krankengut, so fällt immerhin auf, daß 5 von den 7 antikörperpositiven Patienten, das sind 71,4 %, an einer Erkrankung litten, bei der immunologische Vorgänge sicher oder wahrscheinlich eine Rolle spielen. 2 der Patienten hatten eine aplastische Anämie, 2 eine chronische Glomerulonephritis, einer eine hämolytische Anämie. Im Kollektiv waren dagegen immunologische Erkrankungen höchstens mit 29 % vertreten:

#### 10 Aplastische Anämien

3 Thrombopenien allergisch-toxischer Genese

3 Hämolytische Anämien

#### 10 Glomerulonephritiden

3 Colitis ulcerosa

In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, daß bei den Patienten II, III und VI die Antikörperbildung trotz Behandlung mit Cortison erfolgte.

Abhängigkeit der Sensibilisierung von dem Zeitraum, während dem die Transfusionen gegeben wurden:

Bei allen antikörperpositiven Patienten waren die Transfusionen während eines längeren Zeitraumes gegeben worden. Teilt man das Kollektiv der Patienten in zwei Gruppen, wobei die eine Gruppe aus den Patienten besteht, die länger als zwei Monate transfundiert wurden, die andere aus den Patienten, die die Transfusionen während kürzerer Zeit erhielten, so fallen alle positiven Patienten in die erste Gruppe.

| Zahl d.<br>Patienten | davon<br>positiv | Reaktionen (Fieber, Schüttelfrost, Urticaria) |              |           |
|----------------------|------------------|-----------------------------------------------|--------------|-----------|
|                      |                  | ja                                            | nein         | unbekannt |
| 67                   | 7<br>=14,5%      | 27<br>=40,3%                                  | 32<br>=47,7% | 8<br>=12% |

Länger als 2 Monate transfundierte Patienten, durchschnittliche Transfusionszahl : 51.

| Zahl d.<br>Patienten | davon<br>positiv | Reaktionen |              |             |
|----------------------|------------------|------------|--------------|-------------|
|                      |                  | ja         | nein         | unbekannt   |
| 31                   | 0<br>=0%         | 1<br>=3,2% | 23<br>=74,2% | 7<br>=22,6% |

Kürzer als 2 Monate transfundierte Patienten, durchschnittliche Transfusionszahl : 17,4

Bei zwei Patienten war die Sensibilisierungsdauer nicht mehr genau festzustellen.

Tab. 6 :      Abhängigkeit der Sensibilisierung vom Zeitraum während dem transfundiert wurde.

### Klinische Erscheinungen

Aus den Tabellen 5 und 6 ergibt sich, daß, wie zu erwarten, die Transfusionsreaktionen mit steigender Transfusionszahl, vor allem aber mit längerer Sensibilisierungsdauer zunehmen. Zwischen nachweisbarer Antikörperbildung und Transfusionsreaktionen besteht ein klarer Zusammenhang: Von 7 antikörperpositiven Patienten zeigten 5 ( : 71,4 %) Transfusionsreaktionen, während im Kollektiv nur bei 28 % Reaktionen festgestellt wurden.

Anderseits ausgedrückt waren von 28 Patienten mit Reaktionen 5 ( - 17,9 %) antikörperpositiv, während von 57 Patienten ohne Reaktion nur 2 ( - 3,7 %) nachweisbare Antikörper hatten.

Zur Übersicht siehe Tabelle 7.

| Reaktionen                          | Zahl d. Pat. | davon +    |
|-------------------------------------|--------------|------------|
| 1. Kopfweg, Schweißausbr., Übelkeit | 5            | 3          |
| 2. Fieber und Schüttelfrost         | 16           | 1          |
| 3. Urticaria, auch mit 2.           | 7            | 1          |
| Summe                               | 28           | 5 (=17,9%) |
| keine Reaktionen                    | 57           | 2 (= 3,7%) |

Tab. 7 : Häufigkeit nachweisbarer Antikörper bei Patienten mit Transfusionsreaktionen

Bei ASTER waren von den untersuchten Patienten ohne Reaktionen 3,6 % antikörperpositiv, bei denen mit Reaktionen 15,2 % (3). Im Gegensatz zu unserem Beobachtungsgut fielen seine positiven Patienten aber alle unter die Rubrik "Fieber und Schüttelfrost".

Eine posttransfusionelle Purpura im Sinne von SHULMAN, bei der nicht nur die antigenen Plättchen des Spenders, sondern auch die eigenen Plättchen des Empfängers abgebaut werden, konnten wir nicht eindeutig beobachten. Patient I hatte immer normale Thrombozytenwerte. Patient II zeigte eine mäßige Thrombopenie (140 000 - 223 000) und einmal einen schnellen Thrombozytenabfall von 223 000 auf 136 000, der direkt mit einer Transfusion in Zusammenhang gebracht werden konnte. Patient III zeigte Blutungsneigung und zeitweise eine extreme Thrombozytopenie (4 000 - 9 000), die auf Purinethol zurückgeführt wurde, wobei gleichzeitig aber nahezu normale Erythrozytenwerte bestanden. Vierzehn Tage nach Entnahme der positiven Serumprobe, nach Absetzen von Purinethol, waren die Werte schon wieder auf 167 000 angestiegen. Inwieweit die Werte durch die fortlaufend gegebenen Bluttransfusionen beeinflußt wurden, läßt sich schwer abschätzen.

Patient IV hatte eine Thrombopenie von 88 000, die über das Maß der gelegentlich bei Urämien beobachteten Thrombozytopenien (17) hinausgeht. Patient V wies während eines ganzen Jahres fortlaufender Hämodialysen immer annähernd normale Thrombozytenwerte auf.

Patient VI zeigte niedrige Thrombozytenwerte und eine mäßige Blutungsneigung, ohne daß ein eindeutiger Zusammenhang mit Transfusionen gesichert werden konnte, ebenso Patient VII.

## Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand der Literatur ein Überblick über bisherige Untersuchungen an Thrombozyten bezüglich ihrer Antigeneigenschaften und an Thrombozytenantikörpern gegeben. Experimentelle und klinische Beobachtungen an Polytransfundenen wurden mitgeteilt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde über eigene Untersuchungen mithilfe eines Komplementbindungstests berichtet. Die 100 untersuchten Polytransfundenen hatten zwischen 6 und 314, im Durchschnitt 34,2 Transfusionen zu je 500 ml (meistens Vollblut) erhalten. Unter den 100 Patienten fanden sich 7, die mit 16 - 78 % der Testthrombozyten ein positives Ergebnis zeigten.

Die 7 antikörperpositiven Patienten wurden hinsichtlich der Art ihrer Erkrankung, der erhaltenen Transfusionen, der Sensibilisierungsdauer und der Transfusionsreaktionen mit dem Kollektiv verglichen. Dabei ergab sich, daß 5 von den 7 positiven Patienten an einer Erkrankung litten, bei der immunologische Vorgänge eine besondere Rolle spielen, während im Kollektiv solche Erkrankungen höchstens bei 1/3 der Patienten vorlagen. 4 von den antikörperpositiven Patienten hatten weniger Bluttransfusionen erhalten als der Durchschnitt, während andererseits bei 16 Patienten, die erheblich mehr Transfusionen erhalten hatten als der Durchschnitt, nämlich 41 - 314 x 500 ml, keine komplementbindenden Antikörper nachzuweisen waren. Die klinischen Transfusionsreaktionen wie Schweißausbruch, Fieber, Schüttelfrost, Urticaria nahmen dagegen stetig mit der Zahl der Transfusionen zu. Unter den 67 Kranken, die länger als 2 Monate transfundiert worden waren, befanden sich alle 7 antikörperpositiven Patienten, und 27 Patienten, die klinisch Transfusionsreaktionen zeigten, während unter den 31 Patienten, die weniger als 2 Monate lang transfundiert worden waren, keiner antikörperpositiv war und nur einer Transfusionsreaktionen aufwies. Bei den 28 Patienten, die klinische Reaktionen hatten, fanden sich in 17,9 % Antikörper, wohingegen von den 57 Patienten ohne klinische Erscheinungen nur 3,7 % antikörperpositiv waren.

In der Diskussion wurden nach Möglichkeit entsprechende Untersuchungen über die in der Literatur berichtet wird, zum Vergleich herangezogen.

## Summary

The first part of the thesis contains a survey, based on the relevant literature, of the researches which have hitherto been carried out into the antigen character of platelets and into the problem of platelet antibodies. It reports about experimental and clinical observations on polytransfused persons.

The second part of the thesis deals with the author's own investigations made by means of complement fixation tests. The 100 polytransfused persons who have been examined for this purpose had been given 6 - 314 (average 34,2) transfusions at 500 ml each (in most cases whole blood). 7 among them showed a positive antibody result with 16 - 78 % of the test platelets.

These 7 patients were compared with the whole group of the examined persons as to the nature of their disease, the number of the given transfusions, the time of their continuance and the clinical reactions to the transfusions. 5 of the 7 positive patients were suffering from some disease where immunological processes were of particular importance whereas only 1/3 of the collective group suffered from the same kind of disease. 4 of the 7 patients mentioned above had been given less blood transfusions than the average; on the other hand, no complement fixing antibodies could be found in the 16 patients who had been given a considerably greater number of transfusions than the average, that is 41 - 314 à 500 ml. The clinical reactions to transfusions, however, such as strong perspiration, fever, the shivers, or urticaria increased steadily with the number of transfusions. All the 7 patients who had positive antibody reactions were among those 67 persons who had been given transfusions for more than 2 months. Besides 27 patients showed clinical reactions to transfusions. Among the rest of the patients, the 31 who had been given transfusions for less than 2 months, there were no positive antibody reactions, and only one person showed clinical symptoms after the transfusions. Antibodies could be detected in 17,9 % of the 28 patients with clinical reactions, whereas only 3,7 % of the 57 persons without clinical symptoms had a positive antibody reaction.

Investigations as reported in the relevant literature were drawn upon as a comparison wherever this was possible in the discussion.

## Literatur

1. ASTER R.H., COOPER H.E. and SINGER D.L.: Simplified complement fixation test for the detection of platelet antibodies in human serum.  
J. Lab. clin. Med. 63, 162 (1964)
2. ASTER R.H. and JANDL J.H.: Platelet sequestration in man. II. Immunological and clinical studies.  
J. clin. Invest. 43, 856 (1964)
3. ASTER R.H., LEVIN R.H., COOPER H.E., FREIREICH E.J., MORSE E. E., and SINGER D.L.: Correlation of complement - fixing antibodies with platelet survival in thrombocytopenic patients.  
Clin. Res. Proc. 10, 195 (1962)
4. ASTER R.H., SHULMAN N.R., PEARSON H.A. and HILLER M.C.: A complement fixing antibody against a specific antigen responsible for amegacaryocytic neonatal purpura.  
Clin. Res. Proc. 9, 157 (1961)
5. BALDINI M., COSTEA N., and EBBE S.: Studies on the antigenic structure of blood platelets. Proc. 8th Congr. Europ. Soc. Haemat., Wien 1961, p. 378 (Karger, Basel / New York 1962)
6. BOSCH L.J., FABER W.R., ROOD J.J., van, and VERVLOT M.: Results of repeated platelet transfusions (Abstracts).  
Blood 22, 240 (1963)
7. CARPENTER P.L.: Cytolysis and complement fixation  
Aus: Immunology and Serology p. 317 ff  
WB. Saunders Company, Philadelphia and London (1965)
8. CASELL M., PHILLIPS D.R. and CHAPLIN H., Jr.: Transfusion of buffy coat poor red cell suspensions prepared by dextran sedimentation: Description of newly designed equipment and evaluation of its use.  
Transfusion (Philadelphia) 2, 216 (1962)

9. COOMBS R.R.A., and BEDFORD D.: The A and B antigens on human platelets demonstrated by means of mixed erythrocyte platelet agglutination.  
Vox Sang. 5, 111 (1955)
10. DAUSSET J., COLOMBANI J. et EVELIN J.: Présence de l' antigène Rh (D) dans les leucocytes et les plaquettes humaines.  
Vox Sang. 3, 266 (1958)
11. DAUSSET J., FONSECA A., et BRECZY H.: Elimination de certains chocs transfusionels par l' utilisation de sang appauvri en leucocytes.  
Vox Sang. 2, 248 (1957)
12. DAUSSET J. and MALINVAUD G.: Normal and pathological platelet agglutinins investigated by means of the shaking method. Confirmation of the presence of A and B antigens in platelets.  
Vox Sang. 4, 204 (1954)
13. DAUSSET J. and TANGÜN Y.: Leukocyte and platelet groups and their practical significance.  
Vox Sang. 10, 641 (1965)
14. GUREVITCH J. and NELKEN D.: ABO groups in blood platelets.  
Nature (London) 173, 356 (1954)
15. HARRINGTON W.J., SPRACE C.C., MINNICH V., MOORE C.V., AULVIN R.C. and DUBACH R.: Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura.  
Ann. Int. Med. 38, 433 (1953)
16. JAWETZ E., MELNICK J.L. und ADELBURG E.A.: Medizinische Mikrobiologie, p 155,  
Springer-Verlag Berlin/Göttingen/Heidelberg (1963)
17. KAULLA K.N. von und KAULLA E. von: Thrombinbildung vor und nach Nierenübertragungen.  
Klin. Wschr. 44, 364 (1966)

18. LOGHEM J.J. van der, DORFMEIER H., HART M. van der, and SCHREUDER R.: Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang.* 4 161, (1959)
19. MAJSKY A.: Nachweis von MN- und Rh-Antigenen an Thrombozyten mittels des Elutionstestes. *Blut* 6, 280, (1960)
20. MAJSKY A.: Versuche zum Nachweis von Blutgruppenantigenen an menschlichen Thrombozyten mittels der Immunisierung. I. Der D (Rh0) Rezeptor. *Z. Immun.-Forsch.* 125, 125 (1963)
21. MARCHAL G., DAUSSET J., COLOMBANI J., BILSKI-PASQUIER G., et JAULMES B.: Immunisation anti-leucocytaire et anti-plaquettaire provoquée par l'injection répétée du même sang. *Sang* 29, 549 (1958)
22. MOULINIER J.: Isoimmunisation maternelle anti-plaquettaire et purpura néonatal. Le système de groupe plaquettaire "DUZO". *Prox. 6th Congr. Europ. Soc. Haemat., Copenhagen 1957*, p 817 (Karger, Basel/New York 1958)
23. MOUREAU P., et ANDRÉ A.: Présence des antigènes A et B dans les plaquettes. *Vox Sang.* 4, 46, (1954)
24. SCHÄFER K. und GENNERICH H.: Die Blutgruppenspezifität der Thrombozyten. *Klin. Wschr.* 18, 491, (1939)
25. SHULMAN N.R., ASTER R.H., LEITNER A., and HILLER M.C.: Immunoreactions involving platelets. Post-transfusion purpura due to a complement fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen. A proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in "autoimmunity". *J. Clin. Invest.* 40, 1597 (1961)
26. SHULMAN N.R., MARDER F.J., ALEDORT L.M. and HILLER M.C.: Complement-fixing antibodies against antigens common to platelets and leukocytes. *Trans Assoc. Am. Physicians* 75, 89 (1962)

27. SHULMAN N.R., MARDER V.J., ALEDORT L.M. and HILLER M.C.: Isoantibodies against platelets and leukocytes. Proc. 9th Congr. Internat. Soc. Blood Transf., Mexico 1962, p. 439  
(Karger, Basel/New York 1964)
28. SHULMAN N.R., MARDER V.J., HILLER M.C. and COLLIER E.M.: Platelet and leukocyte isoantigens and their antibodies: Serologic, physiologic and clinical studies.  
Progress in Haematology 4, p. 248 ff, Grune & Stratton, New York / London, (1964)
29. STEFANINI M., PLITMAN G.I., DEMESHEK W., CHATTERJEA J.B. and MEDNICOFF I.B.: Studies on platelets. XI. Antigenicity of platelets and evidence of platelet groups and types in man.  
J. Lab. & Clin. Med. 42, 732 (1953)
30. THIERFELDER S.: Die Thrombozytengruppen und ihre klinische Bedeutung. Blut 13, 265 (1966)
31. THIERFELDER S. und PFISTERER H.: Die Thrombozytentransfusion. Vortrag beim Symposium über Thrombozytentransfusion auf der 11. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie, Innsbruck/Österreich 1965.
32. WEERDT Ch. M. van der: Series Haematologica 11, Histocompatibility testing, 161 - 165 (1965)
33. WEERDT Ch. M. van der, WIEL - DORFMEYER H. van de, ENGELFRIET C.P. and LOGHEM J.J. van: A new platelet antigen. Proc. 8th Cong. Europ. Soc. Haemat. Wien 1961, p. 379  
(Karger, Basel/New York 1962)
34. WEERDT Ch. M. van der, VEENHOVEN VON RIESZ L.E., NIJENHUIS L.E., LOGHEM J.J. van: The Zw blood group system in platelets.  
Vox Sang. 8, 513 (1963)

Ich danke Herrn Professor Stich für die Überlassung des Themas und für den Arbeitsplatz im Institut für Hämatologie, Herrn Dr. Thierfelder als dem Leiter der Abteilung Immunnämatologie und Transfusion im Institut für die praktische Anleitung, sowie Fräulein Herrmann und Miss Mc Nicolas für ihre technische Hilfe bei der Durchführung der Tests.



## Lebenslauf

Am 11.10.1941 wurde ich als zweite Tochter des Dr.Wolfgang Mühlberger und seiner Frau Gabriele in Preßburg in der Slowakei geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Hungen/Oberhessen und der Höheren Schule in Frankfurt/Main und Icking/Oberbayern legte ich im Juli 1961 in Icking das Abitur ab.

Vom Herbst 1961 bis zum Physikum im Winter 1964 studierte ich in München Medizin. Nach dem Physikum besuchte ich ein Jahr lang die Universität in Freiburg. Danach kehrte ich nach München zurück, wo ich im Sommer 1967 das Staatsexamen ablegte.









